Beiträge zur Vitamin-C-Bestimmung und Versuche über die Haltbarkeit der Askorbinsäure

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Eberhard Gugath
aus Memel (jetzt Litauen)

Franfurt a. M. 1937

Druck von F. W. Kalbfleisch, Gelnhausen

Referent: Dr. R. Strohecker.

Korreferent: Professor Dr. H. Dieterle.

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 1937.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern!

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 5

I. Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Titration von Vitamin C und von Glutathion mit 2,6-Dichlorphenolindophenol 6

II. Haltbarkeitsbestimmungen von Askorbinsäurelösungen (Vitamin C) 13

III. Beobachtungen an Askorbinsäurebestimmungen nach dem Methylenblauverfahren von E. Martini und A. Bonsignore 18

Zusammenfassung 21

Einleitung.

Zur Vitamin-C-Bestimmung hauptsächlich in frischen pflanzlichen Lebensmitteln hat sich die Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol nach J. Tillmans (1) bestens bewährt.

Die Bestimmung wird derart ausgeführt, daß man zu askorbinsäurehaltigen wässrigen Pflanzenextrakten bezw. zu Preßsäften eine 0.001 n Lösung von 2,6-Dichlorphenolindophenol zulaufen läßt, bis eine schwache Blau- bezw. Rotfärbung bestehen bleibt. Die Entfärbung des Indikators erfolgt meistens flott. Immer konnte man jedoch gegen Ende der Titration bei sorgfältiger Beobachtung eine deutliche Verlangsamung der Reaktion feststellen. Weiterhin hatte man ganz allgemein die Bemerkung gemacht, daß die Entfärbung des Dichlorphenolindophenols beschleunigt wurde, wenn die Vitaminlösung angesäuert wurde.

Um diese Erscheinung aufzuklären, habe ich die im ersten Kapitel der Arbeit beschriebenen Untersuchungen angestellt. Es sollte also die Frage der Geschwindigkeit der Umsetzung zwischen Askorbinsäure (Vitamin C) und Farbstoff in ihrer Abhängigkeit von Konzentration und p_H-Stufe geklärt werden.

Weiterhin wollte ich ermitteln, wodurch Askorbinsäurelösungen, die erfahrungsgemäß leicht der katalytischen Oxydation anheimfallen, besser haltbar gemacht werden könnten.

Neben dem Einfluß, den die p_H-Stufe auf solche Lösungen ausüben dürfte, sollten dann die Arbeiten von C. A. Mawson (2) und von A. E. Kellie und S. S. Zilva (3), in Bezug auf Oxydationsverzögerung der Askorbinsäure durch bestimmte Zusätze geprüft werden.

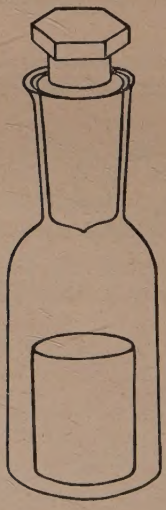
Im letzten Kapitel wurde dann die Vitaminbestimmungsmethode von E. Martini und A. Bonsignore (4) kritisch geprüft.

I. Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Titration von Vitamin C und Glutathion mit 2,6-Dichlorphenolindophenol.

Bei der Titration von Askorbinsäurelösungen nach der Methode von J. Tillmans war, wie schon oben erwähnt, von vielen Forschern besonders gegen Ende der Reaktion eine bedeutende Verlangsamung — sogenanntes „Ziehen" — bei der Entfärbung des Farbstoffs beobachtet worden. Auf diese Tatsache wurde zuerst von K. Trillhose (5) und J. Jackisch (6), späterhin noch von zahlreichen anderen Autoren hingewiesen. Die Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenols schien demnach offensichtlich gehemmt zu werden.

Zur Aufklärung dieser Erscheinung stellte ich nun eine Reihe von Versuchen über die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Vitaminlösungen und dem oben genannten Farbstoff an.

Ich ging von wässrigen 0,001 n-Askorbinsäure-Lösungen aus. Hierbei stellte sich heraus, daß diese nicht den theoretisch zu erwartenden Wert titrierten. Es fand sich bald nach der Herstellung der Lösungen nur noch 50—80% der eingewogenen Askorbinsäure wieder. Aus diesem Grunde ging ich dazu über, nur noch luftfrei gekochtes und stickstoffgesättigtes destilliertes Wasser für meine Lösungen zu benutzen. Jetzt konnte ich regelmäßig etwa 90% des eingewogenen Vitamins wiederfinden.



Figur 1.

Meine Arbeitsweise legte ich folgendermaßen fest: Ich verwendete ein mit eingeschliffenem Glasstopfen versehenes Gläschen, auf dessen Boden ein becherglasartiger kleiner Einsatz angeschmolzen war. (Figur 1).

In den äußeren Teil A kam die Vitaminlösung, in den Einsatz B steigende Mengen Farblösung. Es wurde kurz durchgeschüttelt und mit der Stoppuhr nun jeweils die Zeit gemessen, die vom Durchmischen bis zum Entfärben des Farbstoffs verstrich. Beispielsweise wurden zu je 10 ccm 0,001 n-Vitaminlösung je 5, 6, 7, 8 und 9 ccm 0,001 n Farblösung zugegeben. Die Zeit bis zur Entfärbung betrug dann etwa 1; 1,3; 1,6; 2,7; und 3,8 Sekunden.

Da mir zur Festlegung dieser Werte, besonders im Hinblick auf die kurze Zeitdauer der Reaktion, eine einzige Titration nicht genügend erscheinen konnte, habe ich jeweils fünf, mindestens aber drei Kontrollbestimmungen ausgeführt. Diese nahmen nun immerhin so viel Zeit in Anspruch, daß ich auch bei meinen sorgfältigst hergestellten 0,001 n-Askorbinsäurelösungen — ich habe sogar einen steten Strom gewaschenen Stickstoffs durchgeleitet — während der Dauer der Messungen doch eine starke Abnahme des Reduktionsvermögens feststellen mußte.

Da erfahrungsgemäß bekannt ist, daß Vitaminlösungen bei niedriger p_H-Stufe besser haltbar sind, setzte ich zu meinen Lösungen 3% Essigsäure hinzu; aber auch solche Lösungen erwiesen sich noch als ungeeignet für exakte Messungen. Ueberdies erfolgte der Umschlag des Farbstoffs von rot nach farblos äußerst rasch. Diesem Umstand habe ich allerdings durch Abstumpfen mit Natriumacetat, das unmittelbar vor der Ausführung des Versuchs zugesetzt wurde, abgeholfen. Obwohl der Umschlag bei höherer p_H-Stufe nun langsamer erfolgte, wie ich auch an weiteren Versuchen bei verschiedenen p_H-Stufen beobachtete, mußte ich die Untersuchungen an 0,001 n-Askorbinsäurelösungen wegen ihrer großen Unbeständigkeit aufgeben.

Auch 0,05 n-Askorbinsäurelösungen erwiesen sich noch als ungeeignet.

Erst mit Lösungen, deren Askorbinsäuregehalt mindestens 0,01 normal war, konnte ich meine Versuche durchführen.

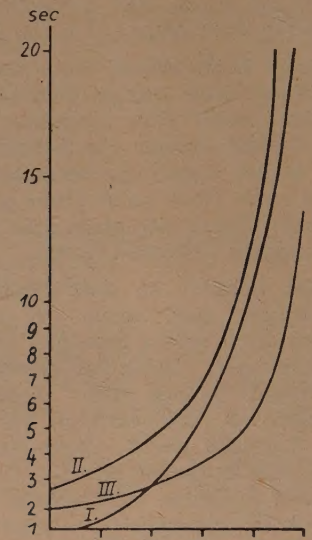
Angefertigt wurde also eine 0,01 n-Vitamin-C-Lösung. Von dieser wurde nun jeweils ein Kubikzentimeter mit steigenden Mengen 0,001 n-Farblösung versetzt; also für 3, 4, 5, 6 usw. ccm Farblösung wurde die Zeit bis zur Entfärbung durch die Askorbinsäure gemessen (Figur 2, Kurve 1).

Auf der Ordinate ist die Zeit in Sekunden eingetragen; auf der Abszisse weiterhin die zugesetzten Farbstoffmengen, umgerechnet auf die Prozente der Gesamtmenge der Askorbinsäure, mit denen sie jeweils zu reagieren vermochten.

Man sieht, daß die zugesetzte Farbstofflösung in geringen Mengen augenblicklich, aber schon nach Zugabe von 70% des für die vorliegende Askorbinsäuremenge notwendigen Farbstoffs merklich langsamer reduziert wurde.

Ich habe zunächst die Verlangsamung der Reaktion auf die Einwirkung der im Gemisch allmählich ansteigenden Menge oxydierter Askorbinsäure zurückgeführt. Meine Annahme wurde aber durch die beiden im folgenden beschriebenen Versuchsreihen A und B nur teilweise bestätigt.

Versuchsreihe A: Je ein Kubikzentimeter 0,01 n-Askorbinsäure lösung wurde austitriert und dieser Lösung jedesmal ein weiterer Kubikzentimeter 0,01 n-Askorbinsäurelösung zugesetzt. Sodann wurde titriert und die Zeit gemessen.



Figur 2.

Askorbinsäure.

Versuchsreihe B: Je ein Kubikzentimeter einer 3%ig essigsauren 0,01 n-Vitamin-C-Lösung wurde mit jeweils 5 ccm einer fast gesättigten Natriumacetatlösung gepuffert und die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Lösung ebenfalls gemessen.

Es zeigte sich nämlich, daß eine deutliche Verlangsamung der Umsetzung bei A um durchschnittlich eine Sekunde zu beobachten war; jedoch nicht mehr, nadem 80% des zur Oxydation notwendigen Farbstoffs zugesetzt waren (Figur 2, Kurve II). Allerdings ist zu berücksichtigen, daß sich die Verzögerung von einer Sekunde im Anfang der Reaktion stärker auswirkt, als am Ende, wo an sich schon die Entfärbung bedeutend langsamer vor sich geht. Der langsamere Reaktionsverlauf konnte daher auch nicht allein auf die Wirkung oxydierter Askorbinsäure zurückgeführt werden.

Bei Versuch B war die Reaktionszeit wieder anders. Man hätte als Darstellung dafür eine Linie wie etwa Figur 2, Kurve I, erwarten können, da ja in der Untersuchungslösung jeweils die gleiche Menge oxidierter Askorbinsäure vorhanden war. Kurve III Figur 2, zeigt, daß die Reaktion rascher vonstatten ging.

Ich fand somit auch hier die aus der Praxis bekannte Erscheinung bestätigt, daß sich reine wässerige Askorbinsäurelösungen schlechter titrieren lassen als gepufferte. Allerdings schien mir die Askorbinsäure-

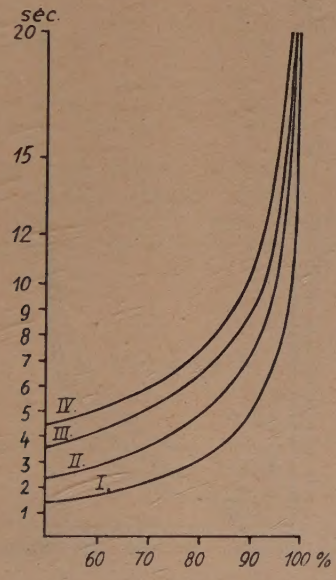
konzentration und die p_H-Stufe der Lösungen einen bestimmten Einfluß auf die Reaktionsdauer auszuüben.

Da nach Versuch B die p_H-Stufe von wesentlicher Bedeutung ist, habe ich bei meinen Versuchen über den Einfluß verschiedener Askorbinsäurekonzentrationen immer bei gleicher p_H-Stufe gearbeitet.

Die zur Messung verwendeten Zitronensäfte wurden über Nacht mit überschüssigem Kalziumkarbonat stehen gelassen. Alsdann wurde der klare neutralisierte Saft durch Abzentrifugieren gewonnen.

Als ersten habe ich einen solchen Zitronensaft in natürlicher Konzentration gemessen; als zweiten einen mit einem Askorbinsäuregehalt, der 0,05 normal, und als dritten einen, dessen Askorbinsäuregehalt 0,001 normal war.

Die bei meinen Messungen gefundenen Zeiten sind in der Figur 3 als Kurven I, II und III eingetragen.



Figur 3.

Askorbinsäure.

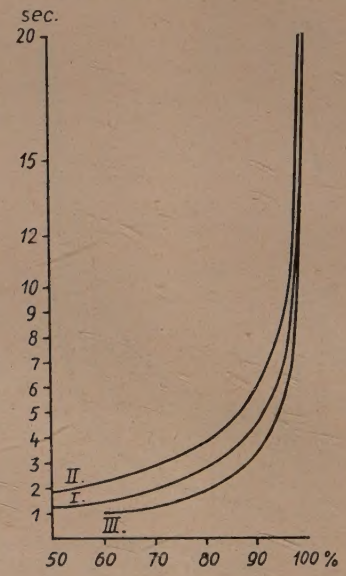
Die Kurve, die der Lösung mit dem stärksten Vitamingehalt entspricht, zeigt einen deutlich rascheren Verlauf der Reaktion gegenüber den beiden anderen. Diese wieder zeigen untereinander ebenfalls eine klar erkennbare Differenz. Es erhellt hieraus, daß die Konzentration der Vitaminlösungen von großer Bedeutung für die Geschwindigkeit der Reaktion ist. Die stärkere Vitaminkonzentration bedingt also den rascheren Reaktionsverlauf.

Zur Feststellung des Einflusses der p_H-Stufe habe ich weitere Versuche angestellt..

Ich verwendete zwei an Vitamin C 0,001 n-Zitronensäfte bei p_H-Stufe 6 und 7. Die Messungen sind in Figur 3, Kurve III und IV, eingetragen.

Man sieht, daß auch diese beiden Kurven gegeneinander verschoben sind, und zwar derart, daß die höhere p_H-Stufe eine Verlangsamung der Reaktion erwirkt hatte. Es war somit für mich klar erwiesen, daß die Geschwindigkeit der Umsetzung von der p_H-Stufe abhängig ist.

Weiterhin wollte ich nun noch feststellen, ob die beobachteten Gesetzmäßigkeiten auch bei anderen vitaminhaltigen Lösungen zu bemerken waren. Zu diesem Zweck habe ich einen Hagebuttenextrakt benutzt, der als reduzierenden Bestandteil Askorbinsäure enthielt. Von diesem Extrakt wurden je eine 0,01 n und 0,05 n-Askorbinsäurelösung von p_H-Stufe 6 hergestellt und gemessen. (Figur 4, Kurve I und II).



Figur 4.

Askorbinsäure.

Es zeigte sich auch hier, wie aus den Kurven deutlich ersichtlich ist, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Maße von der Konzentration abhängig war.

Weiterhin habe ich je eine an Vitamin C 0,01 n-Hagebuttenextraktlösung bei p_H-Stufe 4 und 6 gemessen (Figur 4, Kurve III und I).

Die graphischen Darstellungen zeigten einwandfrei, daß die erwartete Abhängigkeit von der p_H-Stufe zutage trat, und somit waren auch die bei

den Zitronensäften beobachteten Gesetzmäßigkeiten hier deutlich geworden.

Nachdem ich den Verlauf der Reaktionsdauer beim Titrieren von Askorbinsäurelösungen kurvenmäßig festgestellt hatte, drängte sich mir die Frage auf, ob diese Umsetzungen nach dem unimolekularen Schema vor sich gingen oder nicht. Ich wollte also feststellen, ob nur ein Faktor, und zwar der Askorbinsäuregehalt, den Reaktionsverlauf in der gemessenen Zeit bedingt.

Die Geschwindigkeit der Reaktion müßte dann

$$\frac{dx}{dt} = K\,(a - x)$$

sein, wobei dx die in der Zeit dt umgesetzte Menge, a die Anfangskonzentration der Askorbinsäure (also 100%) und x die oxydierte Askorbinsäure bedeutet; K ist dann die Geschwindigkeitskonstante. Das Integral dieser Differentialgleichung ist

$$Kt = \ln \frac{a}{a - x}$$

und somit

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x.}$$

Verläuft die Umsetzung nach diesem Schema, so muß man für K immer einen konstanten Wert erhalten. Neben anderen führte ich für eine 0,01 n-Askorbinsäurelösung (Tab. 1) und für eine Hagebuttenextraktlösung von 0,01 n-Askorbinsäurekonzentration (Tab. 2) die Rechnung durch.

Tabelle 1.

t*)	x	a — x	K
1	55	45	0,799
2	66	34	0,539
2,7	70	30	0,446
3,9	75	25	0,356
5,6	80	20	0,287
8	85	15	0,237
11	90	10	0,209
16,5	95	5	0,182

*) Zeit in Sekunden.

Tabelle 2.

t*)	x	a — x	K
1,4	60	40	0,655
1,9	70	30	0,634
2,7	80	20	0,596
3,4	85	15	0,558
4,4	90	10	0,523
6,7	95	5	0,447
7	95,3	4,7	0,435
10,3	98	2	0,384

*) Zeit in Sekunden.

Wie die beiden Tabellen zeigen, errechnete ich für K jedesmal einen stetig abfallenden Wert. Hieraus ergab sich, daß die Umsetzung nicht dem unimolekularen Schema folgt.

Im Laufe der bisher beschriebenen Versuche hatte sich noch eine weitere interessante Tatsache herausgestellt.

Innerhalb von 20 Sekunden waren jeweils über 95% des vorhandenen Vitamins durch den Farbstoff oxydiert; meistens war das sogar schon nach 15 Sekunden der Fall. Ich konnte also feststellen, daß eine Vitaminlösung innerhalb von 20 Sekunden fast vollständig mit dem zur 100%igen Oxydation notwendigen Farbstoff ausreagiert hatte.

Da vielfach die Tillmans'sche Indophenolmethode wegen ihrer angeblichen Unspezifität angegriffen wurde, besonders deswegen, weil Glutathion und ähnliche Verbindungen ebenfalls mit dem 2,6 Dichlorphenolindophenol reagieren, habe ich auch noch einen Titrationsversuch mit Glutathion angesetzt.

Es stellte sich dabei heraus, daß eine wässerige 0,01 n-Glutathionlösung erst nach 2 Stunden mit dem zur Oxydation notwendigen Farbstoff ausreagiert hatte. Bei Zugabe von nur 40% der notwendigen Farblösung wurde dieselbe auch erst nach etwa 10 Minuten entfärbt, während Askorbinsäure bereits innerhalb einer einzigen Sekunde diese Menge entfärbt hätte.

Man kann also bei Einhaltung der von mir weiter unten beschriebenen Versuchsordnung ganz gut Askorbinsäure, beispielsweise neben Glutathion, bestimmen, wenn man das „Ziehen" bei der Titration über 20 Sekunden hinaus nicht mehr in Rechnung setzt.

Methode der Bestimmung von Askorbinsäure in glutathionhaltigen Lösungen

Durch einfache Indophenoltitration stellt man zuerst den ungefähr zu erwartenden Reduktionswert der Untersuchungslösung fest. Dann gibt man

in eine Anzahl der Titrationsgefäße, wie sie in Fig. 1, S. 6, beschrieben sind, gleiche Mengen der zu untersuchenden Lösung in Raum A. Die Farblösung läßt man in den Einsatz B des Gefäßes einlaufen, und zwar in das erste Glas einen Kubikzentimeter weniger Farblösung als im Vorversuch verbraucht worden war. Je nach der gewünschten Genauigkeit steigert man die Menge der Dichlorphenolindophenollösung in den folgenden Gläsern jeweils um 0,2 oder 0,5 Kubikzentimeter. Die einzelnen Ansätze werden nun kräftig umgeschüttelt und mit der Stoppuhr die Zeit gemessen, die vom Beginn des Schüttelns bis zur völligen Entfärbung verstreicht.

Der richtige Wert ist dann, abgesehen von einem kleinen, praktisch kaum in Rechnung zu setzenden Fehler, der, bei welchem bis zur Entfärbung etwa 20 Sekunden vergingen.

Sämtliches Vitamin C ist innerhalb dieser Zeit erfaßt. Was über 20 Sekunden hinaus noch Farbstoff entfärbt, ist kein Vitamin mehr, sondern einer der Körper, die in langsamer, ziehender Reaktion, auf das 2,6-Dichlorphenolindophenol einwirken, wie z. B. Gluthation.

II. Haltbarkeitsbestimmungen von Askorbinsäurelösungen.

Die Veranlassung zu meinen hier beschriebenen Versuchen waren unter anderen auch die Arbeiten von C. A. Mawson (2) und von A. E. Kellie und S. S. Zilva (3). Die genannten Autoren haben Untersuchungen über die Beeinflussung der Haltbarkeit von Askorbinsäurelösungen durch Organe und Organextrakte angestellt und sich auch mit der Einwirkung von Glutathion, Cystin und ähnlichen Stoffen befaßt. In beiden Arbeiten wird die Tatsache betont, daß das gewöhnliche destillierte Wasser durch seinen Gehalt an geringen Mengen Kupfer und Eisen, die als Katalysatoren wirken, die Oxydation der Askorbinsäure beschleunigt.

Die geringe Haltbarkeit von Askorbinsäurelösungen war auch mir bei den im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuchen öfters aufgefallen, wobei ich eindeutig feststellen konnte, daß die Haltbarkeit einer Askorbinsäurelösung um so besser wird, je mehr Askorbinsäure sie enthält.

Meine Versuche sollten nun weitere Aufklärung über die schützenden Faktoren schaffen, und ich habe zunächst die Untersuchungen mit der Anwendung einfacher, chemisch genau definierter Stoffe begonnen. Zur Herstellung der Askorbinsäurelösungen habe ich bewußt gewöhnliches destilliertes Wasser verwendet, um durch die, in solcher Weise beschleunigte Oxydation der Askorbinsäure, die Versuchsdauer nach Möglichkeit zu kürzen.

Zur Methodik meiner Versuchsanordnung wäre dann noch folgendes zu sagen:

Es wurden in Parallelversuchen abgemessene Mengen von Vitamin-C-Lösungen in Bechergläschen der Einwirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt. Der Askorbinsäuregehalt der Lösungen in den Bechergläschen wurde von Stunde zu Stunde durch Titration ermittelt. Wie ich aber noch später erörtere, bin ich bald dazu übergegangen, meine Untersuchungen in Reagenz-

gläsern, die mit Stopfen verschlossen waren, fortzuführen. Die oberhalb der Askorbinsäurelösung befindliche Luftsäule genügte vollständig zur völligen Oxydation der Askorbinsäure.

Ich begann meine Versuche mit Methanol, Aethanol, Azeton, Glycerin, Invertzucker, Milchsäure, Zitronensäure, Trichloressigsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure. Von diesen Stoffen fertigte ich mir mit einfach destilliertem Wasser 0,1 molare bezw. 0,1 normale Lösungen an und löste in jeweils 100 ccm derselben 0,088 g also, die dem Aequivalentgewicht entsprechende Menge Askorbinsäure. Ich hatte somit auch eine 0,01 n-Vitamin-C-Lösung bereitet. Je einen Kubikzentimeter dieser Lösungen gab ich nun in Bechergläschen und überließ diese sich selbst. Von Stunde zu Stunde kontrollierte ich dann durch Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol die Menge der noch vorhandenen Askorbinsäure.

Es stellte sich dabei heraus, daß die Lösungen mit Methanol, Aethanol, Aceton und Invertzucker sich genau so wie eine reine Askorbinsäurelösung verhielten; also, daß diese Stoffe weder stabilisierend noch zerstörend wirkten. Demgegenüber verhielten sich die Lösungen von Milchsäure, Zitronensäure, Trichloressigsäure, Phosphorsäure, Salzsäure und Schwefelsäure ganz erheblich besser.

Etwa in die Mitte zwischen beide Gruppen stellte sich die Glycerinlösung.

Die bessere Haltbarkeit der Säuremischungen führte ich zum großen Teil auf die niedrigere p_H-Stufe dieser Lösungen zurück. Deswegen begann ich nun systematisch an Säuremischungen, die auf bestimmte p_H-Stufen eingestellt waren, die Oxydierbarkeit der Askorbinsäure zu messen. Angefangen habe ich mit einem Versuch bei $p_H = 2$. Eingestellt wurden die Mischungen gegen Zitrat-Salzsäure-Lösungen nach Soerensen mit Hilfe der Roederschen p_H-Apparatur.

Ich habe diese Einstellung folgendermaßen vorgenommen:

In eines der beiden Glasgefäße füllte ich die Vergleichslösung von bestimmter p_H-Stufe und in das andere eine abgemessene Menge destillierten Wassers. Hierzu ließ ich nun so lange Säure zufließen, bis die Quecksilbersäule des Kapillarelektrometers bei Stromschluß keinen Ausschlag mehr gab, und somit die gewünschte p_H-Stufe ereicht war. Durch einfache Rechnung konnte ich dann für jede gewünschte Menge an Lösungen den Zusatz erhalten. Bei den mit Natronlauge neutralisierten Lösungen ging ich ähnlich vor; nur habe ich hier natürlich Natronlauge zu bereits mit der betreffenden Säure hergestellten Mischungen zufließen lassen bis wiederum deren gewünschte p_H-Stufe erreicht war. Die einer 0,01 n-Askorbinsäurelösung entsprechende Menge Vitamin C fügte ich dann zu. Eine Aenderung der p_H-Stufe trat dabei, wie die Kontrolle zeigte, nicht mehr ein.

Ich fand nun bei meinen Haltbarkeitsversuchen, daß sich die eben erwähnten organischen und anorganischen Säuren ziemlich gleich verhielten. Ein Uebelstand war aber, wie auch früher schon angedeutet, aufgetreten. Die Lösungen, von denen sich ja nur je ein Kubikzentimeter in den Bechergläschen befand, trockneten infolge Verdunstens bald ein. Es blieb dabei zu beachten, daß sich einerseits dann die p_H-Stufe änderte und anderer-

seits trockene Askorbinsäure gegenüber Luftsauerstoff sich sehr wenig empfindlich zeigt. Um die Verdunstung auf ein Mindestmaß herabzudrücken, habe ich dann mit verschlossenen Reagenzgläschen gearbeitet. Auf diese Art konnten die Mischungen von $p_H{}^{=1}$ bis $p_H{}^{=4}$ gemessen werden.

Es ergab sich dabei, daß sich diese sämtlichen Lösungen als haltbarer erwiesen, als eine reine Askorbinsäurelösung, die mit destilliertem Wasser hergestellt war (Tabelle 3). Am langsamsten oxydiert wurden die Vitaminlösungen in Salzsäure und Trichloressigsäure bei p_H-Stufe 1 und Zitronensäure bei p_H-Stufe 2. Nach 9 Stunden fand ich hier noch 90% und 84% bezw. 86% des anfänglich vorhandenen Vitamins C wieder.

Tabelle 3.

Askorbinsäure 0,01 normal in:	bei	Gehalt an Vitamin C in Prozenten ausgedrückt nach 1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9. Stunden
Milchsäure	p_H-Stufe 1.	90	87	85	84	82	80	79	77	75
Zitronensäure		97	95	93	92	88	87	85	83	80
Trichloressigsäure		100	99	98	97	95	92	89	87	84
Phosphorsäure		95	91	87	84	81	78	76	73	70
Salzsäure		100	99	99	98	97	96	94	92	90
Schwefelsäure		96	92	87	83	81	76	73	70	67
Milchsäure	p_H-Stufe 2.	99	95	92	90	88	87	85	83	81
Zitronensäure		99	97	95	94	92	90	89	87	86
Trichloressigsäure		98	96	93	90	87	85	83	80	77
Phosphorsäure		99	95	92	88	85	81	78	74	72
Salzsäure		95	91	87	83	81	78	76	73	71
Schwefelsäure		97	94	92	89	87	86	84	82	79
Milchsäure	p_H-Stufe 3.	98	93	89	85	83	80	78	75	72
Zitronensäure		98	95	82	90	85	81	77	74	72
Trichloressigsäure		97	92	89	87	85	83	80	78	76
Phosphorsäure		98	95	91	87	84	79	75	70	66
Salzsäure		97	93	90	87	83	79	76	73	70
Schwefelsäure		99	97	94	92	90	87	84	82	79
Milchsäure	p_H-Stufe 4.	97	94	91	86	83	78	73	—	—
Zitronensäure		98	95	92	89	85	80	75	—	—
Trichloressigsäure		97	95	92	88	86	84	80	77	74
Phosphorsäure		97	93	90	86	83	79	76	74	72
Salzsäure		98	94	90	87	84	81	77	74	72
Schwefelsäure		98	95	92	88	84	80	77	74	72
Wasser		96	90	84	80	75	71	67	63	60

Im Anschluß an diese Feststellungen führte ich dann weitere Versuche über die Haltbarkeit der Askorbinsäure in der Nähe des Neutralpunktes aus.

Ich verwendete wiederum die schon erwähnten sechs Säuren, die mit Natronlauge auf die p_H-Stufen 5, 6 und 7 gepuffert wurden. Die Askorbinsäurekonzentration darin war wie immer 0,01 normal.

Da sich nach längerem Stehen in einzelnen Versuchsgläschen Bakterienwachstum gezeigt hatte, habe ich jetzt je Glas einen Tropfen Toluol hinzugefügt. Da Toluol ein starkes Bakteriengift ist, konnte ich annehmen, daß hierdurch Einflüsse vonseiten der Bakterien ausgeschlossen wurden.

Genau wie früher wurde nun von Stunde zu Stunde gemessen. Ganz allgemein ließ sich dabei bald die Feststellung machen, daß sich die Askorbinsäurelösungen bei p_H-Stufe 5, 6 und 7 ziemlich schlecht hielten. Die einzelnen p_H-Stufen untereinander zeigten kaum einen besonderen Einfluß auf die Askorbinsäure. Dagegen spielte die Art der Säure eine beträchtliche Rolle.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, schützten Milchsäure und Zitronensäure am schlechtesten vor Oxydation. Die übrigen Säuremischungen verhielten sich, abgesehen von der Phosphorsäure-Vitamin-C-Lösung, die auch sehr leicht oxydiert wurde, fast wie reine Askorbinsäurelösungen.

Tabelle 4.

Askorbinsäure 0,01 normal in:	bei	Gehalt an Vitamin C in Prozenten ausgedrückt nach 1.	2.	3.	4.	5.	6.	7. Stunden
Wasser		90	83	76	70	66	63	60
Milchsäure	p_H-Stufe 5.	78	59	51	40	30	14	—
Zitronensäure		92	83	68	55	48	43	35
Trichloressigsäure		91	86	80	75	72	69	66
Phosphorsäure		90	78	67	60	51	43	—
Salzsäure		90	84	80	76	72	68	63
Schwefelsäure		93	85	80	70	66	60	49
Milchsäure	p_H-Stufe 6.	76	63	45	22	14	—	—
Zitronensäure		83	73	64	53	46	40	24
Trichloressigsäure		93	87	82	80	77	73	68
Phosphorsäure		72	60	53	45	40	35	—
Salzsäure		90	85	81	76	74	72	—
Schwefelsäure		94	85	82	75	70	64	58
Milchsäure	p_H-Stufe 7.	73	60	46	33	24	16	—
Zitronensäure		83	77	66	57	50	43	36
Trichloressigsäure		91	87	81	75	70	67	64
Phosphorsäure		68	52	37	34	27	—	—
Salzsäure		90	85	80	75	70	65	61
Schwefelsäure		93	88	80	75	70	63	57

Die soeben beschriebenen Lösungen stellten, wie sich ja aus ihrer vorher besprochenen Herstellung ergibt, Säure-Salzmischungen von bestimmter p_H-Stufe dar.

Ich wollte daher auch noch feststellen, wie sich etwa Vitamin-C-Lösungen verhielten, die mit reinen 1%igen Natriumchlorid- und Kaliumchloridlösungen hergestellt waren.

Es stellte sich heraus, daß sich beide Ansätze fast gleich verhielten. Innerhalb von sechs Stunden waren etwa 25% der vorhandenen Askorbinsäure oxydiert. Eine Messung nach 24 Stunden zeigte, daß noch 20—30% nicht oxydiertes Vitamin C vorhanden war.

Diese Mischungen stellten sich also innerhalb unserer Versuchsreihe — wie auch nach ihren p_H-Stufen zu erwarten war — zwischen die Lösungen von p_H-Stufe 4 und p_H-Stufe 5.

Ich habe nun weiterhin Versuche über den Einfluß von Eiweiß und Glukosamin auf die Haltbarkeit der Askorbinsäure angestellt. Der Grund hierfür war die Tatsache, daß C. A. Mawson (2) und A. E. Kellie und S. S. Zilva (3) eine schützende Wirkung mit Organextrakten erzielt haben.

Meine für diese Versuche benützten Askorbinsäurelösungen enthielten 2% Hühnereiweiß bezw. 0,1% Glukosaminhydrochlorid. Ich erzielte mit solchen Ansätzen gegenüber einer reinen Vitamin-C-Lösung eine beachtliche Oxydationsverzögerung. Es wurden bei Parallelversuchen zwar schwankende Werte gefunden, jedoch waren nach 24 Stunden noch in jedem Falle mindestens 50% der eingewogenen Askorbinsäure vorhanden.

Eine Vitaminlösung ohne Eiweißzusatz enthielt dagegen nach dieser Zeit nur noch etwa 20—30% des ursprünglichen Reduktionsvermögens.

Diese Versuche hatten also gezeigt, daß vom Eiweiß bezw. Glukosamin eine schützende Wirkung auf die Askorbinsäure ausgeübt wurde.

Zum Beweise setzte ich noch einige Versuche an.

Hierfür verwendete ich 0,01 n-Askorbinsäurelösungen aus doppelt destilliertem Wasser mit einem Kupfersulfatzusatz von 2 mg in 100 ccm — das eine Mal mit einem 2%igen Eiweißzusatz (L. 1) und das andere Mal ohne denselben (L. 2). Aus der folgenden Tabelle 5 ist ersichtlich, daß meine Annahme stimmte.

Tabelle 5.

Zeit in Stunden	L. 1	L. 2
2	89%	62%
4	64%	43%
6	47%	27%

Die eiweißhaltige Lösung schützte das Vitamin C auch hier erheblich vor der, durch das in der Mischung vorhandene Kupfer, katalytisch beschleunigten Oxydation.

III. Beobachtungen an Askorbinsäurebestimmungen nach dem Methylenblauverfahren

von E. Martini und A. Bonsignore

Zur Bestimmung der Askorbinsäure (Vitamin C) wurden in neuerer Zeit einige Methoden empfohlen, die der viel geübten Indophenoltitration nach J. Tillmans gegenüber spezifischere Werte liefern sollen. Besonders das von E. Martini und A. Bonsignore (4) veröffentlichte Methylenblauverfahren wird von K. Wachholder und H. H. Podestà (7) als das in den meisten Fällen beste hingestellt. Sie glauben sogar, die Tillmans'sche Methode ganz allgemein als unspezifisch verwerfen zu können.

Da mir diese Angaben als zumindest nachprüfenswert erschienen, habe ich die Titration mit Methylenblau einer kritischen Prüfung unterzogen.

E. Martini und A. Bonsignore haben, fußend auf der Annahme, daß dem Vitamin C ein ganz bestimmtes Reduktions-Oxydations-Potential zukommt, ihre Methode auf der unter besonderen Umständen erfolgenden Reduktion von Methylenblau aufgebaut. Bei intensiver Belichtung verschiebt sich das Potential nämlich sehr bald nach der negativen Seite. Sie fanden im Methylenblau einen Farbstoff, der sich unter diesen Bedingungen leicht durch Askorbinsäure in seine Leukobase überführen läßt. Während ohne starke Belichtung das Methylenblau nur sehr langsam oder garnicht reduziert wird, läßt es sich bei Belichtung infolge der erwähnten Verschiebung des Potentials nunmehr leicht entfärben.

E. Martini und A. Bonsignore verwendeten eine Methylenblaulösung von der Verdünnung 1:10000, die ungefähr 0,002 normal ist. Sie haben nun so gearbeitet, daß sie sich zur Titration einen 8%ig trichloressigsauren Extrakt herstellten. Diesen versetzten sie mit einer Pufferlösung (37,5 g neutrales Natriumzitrat und 10 g Natriumbikarbonat auf 250 ccm Wasser) und endlich mit etwas 5%iger Thiosulfatlösung. Der Zusatz der Pufferlösung geschieht, um durch Kohlensäureentwicklung den im Reaktionsgemisch vorhandenen Sauerstoff zu vertreiben. Der Thiosulfatzusatz erfolgte zur Verhinderung einer allzu raschen Widerauffärbung der gebildeten Leukobase des Farbstoffs.

Im einzelnen verfahren also die Autoren in folgender Weise:

5 ccm des Extraktes werden mit 2 ccm der Pufferlösung, 1 ccm der Thiosulfatlösung und 0,2 ccm Methylenblaulösung gemischt.

Als Vergleichsprobe dient ein Ansatz von 8 ccm destillierten Wassers, der ebenfalls 0,2 ccm Methylenblaulösung enthielt. Zur askorbinsäurehaltigen Lösung wird nun so lange Methylenblaulösung zugesetzt, bis die Farbstärke mit der Vergleichsprobe übereinstimmt.

Die Titration muß bei starker Belichtung innerhalb von 2 Minuten beendet werden. Eine Glühbirne von Philips (für Kinoprojektion) von 300 Watt mit Reflektor und 2 Konvexlinsen dient als Lichtquelle.

Um den Verbrauch an Methylenblaulösung mit der vorhanden gewesenen Askorbinsäure in Beziehung zu bringen, haben die Verfasser an-

genommen, daß Methylenblau und Vitamin C äquimolekular reagieren. Dann ergibt sich aus den Molekulargewichten, daß ein Kubikzentimeter der Methylenblaulösung 1:10000 0,0478 mg Askorbinsäure entspricht. Diesen theoretischen Titer — weiterhin auch Faktor oder Quotient genannt — von 0,0478 bezw. einen nahe dabei liegenden von 0,05 haben E. Martini und A. Bonsignore bei ihren Versuchen erhalten.

Andere Forscher haben höhere Titer gefunden z. B. W. Neuweiler (8), der für seine Untersuchungen einen Quotienten von 0,09 angibt. Er benutzte als Beleuchtungsquelle eine Osram-Nitraphot-K-Lampe von 6000 Lm. Seine Versuchsanordnung ist im übrigen die gleiche wie bei E. Martini und A. Bonsignore.

K. Wachholder und H. Podestà (7), die auffallenderweise den von ihnen ermittelten Titer nicht angeben, haben in etwas abgeänderter Form gearbeitet. Sie nehmen als Vergleichslösung nicht mehr 8 ccm Wasser mit 0,2 ccm Methylenblauzusatz, sondern benutzen eine Lösung, die 5 ccm 8%ige Sulfosalicylsäure, dazu 2 ccm Pufferlösung, 1 ccm Thiosulfatlösung und 0,2 ccm Methylenblau 1:10000 enthält. Als Belichtungsquelle diente eine Osram-Nitraphot-B-Lampe von 500 Watt.

Ich habe für meine Versuche die im folgenden aufgeführten Lösungen verwandt:

1.) 0,1 g Methylenblau med. chem. rein und chlorzinkfrei D.A.B. VI von Merck in einem Liter destillierten Wassers gelöst.

2.) 37,5 g neutrales Natriumzitrat von Merck (Ergänzungsbuch zum D.A.B.) und 10 g Natriumbikarbonat für Analyse (Riedel-de Haën) wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 250 ccm aufgefüllt.

3.) 5 g Natriumthiosulfat pro analysi (Merck, mit Garantieschein) wurden ebenfalls gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Diese Lösung wurde jeweils für einen Tag frisch bereitet.

Meine Vitaminlösungen (aus reiner kristallisierter Askorbinsäure) habe ich entweder mit 8%iger Sulfosalicylsäure oder 8%iger Trichloressigsäure hergestellt. Verwandt wurden entweder: acidum sulfosalicylicum pro analysi (Merck, mit Garantieschein) oder acidum trichloraceticum cryst. D.A.B. VI (Merck).

Um den für die Herstellung der Methylenblaulösung verwandten Farbstoff auf seine Reinheit prüfen zu können, suchte ich nach einem passenden Einstellungsverfahren.

Es ergab sich, daß das von J. Tillmans, P. Hirsch und W. Hirsch (9) für die Einstellung des 2,6-Dichlorphenolindophenols beschriebene Titantrichloridverfahren in entsprechender Abwandlung hierfür geeignet ist.

Ich bereitete aus einer frischen, bei Merck käuflichen 10—15%igen salzsauren Titanchloridlösung eine Verdünnung von 1:100. Diese nun etwa 0,01 n-Lösung stellte ich ihrerseits gegen eine 0,01 n-Ferrisalzlösung — 4,8221 g Ferriammoniumsulfat ($Fe(NH_4)(SO_4)_2.12H_2O$) in 0,002 n-Schwefelsäure zu einem Liter gelöst — ein. Und zwar gab ich zu einer Mischung von 5 ccm Ferrisalzlösung, 5 ccm

Schwefelsäure (1 + 3) und 5 ccm 10%iger Rhodankaliumlösung aus einer Feinbürette so lange Titantrichloridlösung zu, bis die Rotfärbung verschwand. Zu 40 ccm Methylenblaulösung setzte ich nun ihrerseits 10 ccm Schwefelsäure (1 + 3) und etwa 3 g kristallisierte Oxalsäure, rührte gut durch und ließ wiederum aus der Feinbürette Titantrichlorid dazu bis die blaue Farbe verschwand.

Der Umschlagspunkt läßt sich gut erkennen, obwohl bald wieder Bläuung der Lösung eintritt. Relativ rasches Arbeiten ist bei der Einstellung am Platze, wobei man nach einander einerseits die Titanlösung gegen die Ferrisalzlösung, andererseits die Methylenblaulösung gegen Titantrichlorid titriert.

Die Einstellung ergab, daß tatsächlich 186,5 g des verwendeten Methylenblaus ein Aequivalent Sauerstoff (8 g) abgeben.

Bei der Vitamintitration ging ich in der von H. Wachholder und H. H. Podestà beschriebenen Weise vor und benutzte zunächst eine 8%ig sulfolsalicylsaure Lösung von 0,5—0,7 mg Askorbinsäure in 100 ccm. Die von W. Neuweiler angegebenen Höchstwerte eines Verbrauches von höchstens 1,5—1,8 ccm Methylenblaulösung, entsprechend 0,066—0,079 mg Askorbinsäure, wurden also noch nicht erreicht.

Als Belichtungsquelle diente mir eine Osram-Nitraphot-B-Lampe von 500 Watt und 11000 Lm. mit Refelektor. Dann arbeitete ich in einer Entfernung von durchschnittlich 20—25 cm von der Lampe in kaltem Wasserbad, als welches eine große weiße Porzellankasserole verwendet wurde. Die Dauer der Titration habe ich auf 2 Minuten beschränkt, da nach dieser Zeit eine weitere Entfärbung offensichtlich nicht auf eine Reduktion durch Askorbinsäure hätte zurückgeführt werden können. Die Zugabe von Methylenblaulösung zur Vitaminlösung geschah auf die Art, daß ich immer erst etwas über die Vergleichsprobe hinaus entfärben ließ und dann wieder Methylenblau zugab, bis die Farbstärke der Vergleichslösung von der askorbinsäurehaltigen Mischung übertroffen wurde.

Bei meinen Versuchen stellte sich nun bald heraus, daß ich nur in seltenen Fällen annähernd den von E. Martini und A. Bonsignore angegebenen Faktor von 0,05 heraustitrieren konnte. In den meisten Fällen erhielt ich, wie auch eine Reihe anderer Autoren höhere, aber immer schwankende Werte — bis etwa 0,08.

Hierzu bemerke ich ausdrücklich, daß bei allen diesen Versuchen gleiche Bedingungen eingehalten wurden. Einigermaßen übereinstimmende Faktoren konnte ich überhaupt nur an ein und derselben Askorbinsäurelösung am gleichen Tage erhalten.

Da auch mehrfach eine starke, völlig unerwartet auftretende Entfärbung der Vergleichslösung beobachtet wurde, obwohl täglich mit einer frisch bereiteten Thiosulfatlösung gearbeitet wurde, gab ich die Arbeit mit der von K. Wachholder und H. H. Podestà angewandten Vergleichslösung auf und habe weiterhin nur destilliertes Wasser mit einem Zusatz von 0,2 ccm Methylenblau 1:10000, wie auch von E. Martini und A. Bonsignore und W. Neuweiler angegeben, verwandt.

Aber auch hier ließ sich kein exakter Wert feststellen, der für weitere quantitative Askorbinsäurebestimmungen hätte als Grundlage dienen können. Ob es sich nun um sulfosalicylsaure oder trichloressigsaure Lösungen handelte, blieb sich gleich.

Auffallend ist meines Erachtens, daß der von E. Martini und A. Bonsignore angegebene Faktor von 0,05 auch von anderen Autoren nicht erhalten wurde. Ammon und Hinsberg (10) sowie Caffier und Ammon (11) fanden dafür 0,086 und W. Neuweiler gar 0,09.

Der Letztgenannte weist auf die starke p_H-Abhängigkeit des Faktors hin. So fand er für die p_H-Stufe 4 einen Quotienten von 0,09, für die p_H-Stufe 5 einen von 0,12.

Das entspricht auch vollständig dem Verlauf der Kurve über die Abhängigkeit des Normalpotentials von Methylenblau von der p_H-Stufe, wie von I. B. Conant (12) angegeben wird.

Das Methylenblauverfahren — so wie es beschrieben wurde — erwies sich auf Grund meiner Beobachtungen als ungeeignet für quantitative Vitamin-C-Bestimmungen. Der Grund hierfür ist darin zu sehen, daß es mir unmöglich war, überhaupt einen zuverlässigen, für die Titration brauchbaren Faktor zu erhalten. Die Ursache für das Schwanken des Faktors war nicht festzustellen; doch werden wohl der Arbeitsabstand von der Lampe und die Verwendung von Vergleichslösungen, die Sulfosalicylsäure enthalten, an der Unsicherheit der Methode mit schuldig sein.

Auch H. Kaiser (13) weist darauf hin, daß wohl jeder Beobachter auf Grund der stark „ziehenden" Titrationen andere Endpunkte ablesen dürfte.

Es empfiehlt sich, an dieser Stelle darauf hinzuweisen, daß sich die Indophenolmethode nach J. Tillmans bei dem in unserem Institut ausgeführten Vitamin-C-Bestimmungen an frischen pflanzlichen Lebensmitteln durchaus bewährt hat.

Wenn K. Wachholder und H. H. Prodestà in ihrer Arbeit glauben, dieses Verfahren ganz allgemein als unspezifisch verwerfen zu müssen, so muß diese Behauptung zurückgewiesen werden, da sich ihre Beobachtungen doch wohl nur auf die von ihnen an tierischem Material angestellten Untersuchungen beziehen dürften.

Zusammenfassung.

1.) Es wurde gefunden, daß bei der Titration von Vitamin C mit 2,6-Dichlorphenolindophenol mehrere Faktoren einen maßgeblichen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausüben.

Die Untersuchungen ergaben, daß reine Askorbinsäurelösungen sehr langsam, „ziehend" mit dem Farbstoff reagieren, und daß diese Reaktion durch Anwesenheit von Salzen oder durch Zugabe von Säuren in erstaunlicher Weise beschleunigt werden konnte.

Weiterhin wurde eine deutliche Abhängigkeit der Reaktionsdauer von der Askorbinsäurekonzentration festgestellt, und zwar derart, daß konzentriertere Askorbinsäurelösungen auch schneller reagieren. Ebenso erhöht eine niedrigere p_H-Stufe die Reaktionsgeschwindigkeit.

Es zeigte sich, daß innerhalb von 20 Sekunden alles Vitamin C mit dem Farbstoff ausreagiert hat, während beispielsweise Gutathion erst innerhalb von 2 Stunden erfaßt war.

2.) Versuche über die Haltbarkeit von Askorbinsäurelösungen ergaben, daß der p_H-Stufe der betreffenden Lösung eine gewisse Bedeutung zukommt.

Verglichen mit der Haltbarkeit einer reinen Askorbinsäurelösung bewirkte eine niedrigere p_H-Stufe eine Verzögerung der Oxydation, während sinngemäß eine höhere p_H-Stufe den Rückgang des Reduktionsvermögens beschleunigte.

Außerdem konnte durch Eiweißzusatz zu den Versuchslösungen eine beträchtliche Verhinderung der Oxydation von Vitamin C erzielt werden.

3.) Die Methylenblautitration des Vitamin C nach dem Verfahren von E. Martini und A. Bonsignore konnte von mir wegen ihrer wohl noch durch die Arbeitsweise bedingten Mängel nicht als einwandfreie Bestimmung der Askorbinsäure anerkannt werden.

Schriftennachweis.

(1) R. Strohecker und R. Vaubel: Angew. Chemie 1936 Nr. 37 Seite 666—68 (49).

(2) C. A. Mawson: Biochem. J. 1935 März S. 569—79 (29).

(3) A. E. Kellie und S. S. Zilva: Biochem. J. 1935 Mai S. 1028—35 (29).

(4) E. Martini und A. Bonsignore: Biochem. Zeitschr. 1934 170—77 (273).

(5) K. Trillhose: Inaugural-Dissertation Frankfurt a. M. 1930.

(6) J. Tillmans, P. Hirsch und J. Jackisch: Zeitschr. f. Unters. der Lebensm. 1932 S. 241 (63).

(7) K. Wachholder und H. H. Podestà: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Physiolog. Chemie 1936 S. 149—61 (239).

(8) W. Neuweiler: Klin. Wochenschr. 1936 S. 854—56 (24).

(9) J. Tillmans, P. Hirsch und W. Hirsch:: Zeitschr. f. Unters. der Lebensm. 1932 S. 1—30 (163).

(10) Ammon und Hinsberg: Klin. Wochenschr. 1936 S. 85 (1).

(11) Caffier und Ammon: Zbl. Gynäk. 1936, 1.

(12) I. B. Conant: Chem. Reviews 1926 S. 1 (3).

(13) H. Kaiser: Angew. Chemie 1936 Nr. 42 S. 752 (49).

Lebenslauf.

Ich, Eberhard Gugath, wurde am 21. Mai 1910 zu Memel (Memelgebiet) als Sohn des Holzkaufmanns Max Gugath geboren. Ich besuchte zunächst die Fischersche Knabenvorschule und dann das Luisengymnasium in Memel, wo ich Ostern 1929 das Zeugnis der Reife erhielt. Anschließend trat ich als Praktikant in die Goldene Adler-Apotheke in Memel ein und bestand im März 1931 in Königsberg i. Pr. das pharmazeutische Vorexamen. Nach siebenmonatiger Konditionszeit in derselben Apotheke leistete ich meiner Militärpflicht genüge und begann danach mit dem Sommersemester 1933 das pharmazeutische Studium an der Universität in Halle a. S. Im Frühjahr 1935 bestand ich dortselbst meine Staatsprüfung. Im Sommersemester 1935 arbeitete ich im pharmazeutischen Institut der Universität in Frankfurt a. M. organisch präparativ und begann anschließend am hiesigen Universitätsinstitut für Nahrungsmittelchemie unter Leitung von Herrn Dr. habil. R. Strohecker die vorliegende Arbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde im Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie, Frankfurt a. M., auf Anregung des derzeitigen Leiters,

Herrn Dr. phil. habil. R. Strohecker,

unternommen und durchgeführt.

Ich erlaube mir, auch an dieser Stelle Herrn Dr. phil. habil. R. Strohecker, meinem hochverehrten Lehrer, sowie Herrn Dr. R. Vaubel für die jederzeit bereitwilligst erteilten wertvollen Ratschläge und das rege Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachten, meinen herzlichsten Dank zu sagen.